

1 Einleitung

Krebs repräsentiert nicht eine einzige Krankheit, sondern eine Sammlung diverser Krankheiten mit verschiedenen Lokalisationen im Gewebe. Die betroffenen Zellen können nahezu jeden Ursprungs sein, wobei ihnen bestimmte biologische Eigenschaften gemein sind. Die Zellen lassen sich in benigne (gutartige) Tumoren, die in der Regel langsam wachsen und sich klar von ihrem umgebenden Gewebe abgrenzen, und maligne (bösartige) Tumoren, bei denen das Wachstum nicht eingegrenzt ist, sondern in das umliegende Gewebe (invasiv) geht und es zerstört, einteilen. Zudem gelangen einzelne Tumorzellen in das lymphatische System, über das sie viele Regionen des Körpers erreichen und Metastasen bilden können. Tumoren werden nach ihrem Entstehungsgewebe eingeteilt. So werden epitheliale maligne Tumoren aus Ektoderm und Entoderm als Karzinome, maligne mesenchymale Tumoren aus dem Mesoderm als Sarkome und embryonale Tumoren aus undifferenzierten Geweben als Blastome bezeichnet.

Eine Klassifizierung des malignen Wachstums erfolgt durch histologische Charakterisierung des Tumorgewebes. Entscheidend ist das Verhältnis zwischen den noch differenzierten Zellen des Tumors zu den bereits undifferenzierten Tumorzellen. Tumoren werden in Stadien (I – IV) eingeteilt. Diese lassen sich aus der sogenannten TNM-Klassifizierung ableiten, die sich aus Größe und Aussehen des Primärtumors (Tumor) sowie der mengenmäßigen Erfassung von regionären Lymphknotenmetastasen (Nodus) und Fernmetastasen (Metastase) zusammensetzt.

1.1 Tumorbehandlungen

Die frühe Diagnose eines Tumors ist meistens das entscheidende Kriterium für den Erfolg einer Krebstherapie. Da bei Krebs die Möglichkeit eines Rückfalls (Rezidiv), also des erneuten Verschlechterns der Tumorerkrankung nach einer erfolgreichen Behandlung, oder des Fortschreitens des Tumorstadiums (Progression) besteht, ist das Ziel einer kurativen Therapie, dieses erneute Auftreten des Tumors zu verhindern. Dies ist nur bei einer kompletten Remission möglich. Die palliative Behandlung geht hingegen nur von der Linderung der Symptome und Verbesserung der Lebensqualität aus. Als kurative Verfahren finden Chirurgie sowie Strahlen-, Chemo- und Hormon-

therapien Anwendung. Die ersten beiden Verfahren dienen primär der lokalen Tumorkontrolle, während sich die Chemotherapie für die systemische Behandlung eignet. Aufgrund der Unterschiede im Zellwachstum zwischen Tumorzellen und normal differenzierten Zellen wirken die meisten heute verwendeten, tumorbekämpfenden Mittel auf Gewebe mit einer hohen Teilungsrate. Sind diese Unterschiede aber nicht so groß, werden bei der Behandlung auch gesunde Zellen mit hoher Teilungsrate (Knochenmark, Magen-Darm-Epithel, Haut- und Haarfollikel) beeinträchtigt. Hieraus resultieren die schweren Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden, Übelkeit, Durchfall und Erbrechen sowie Haarausfall, Hemmung der Hämatopoese, Immunsuppression und Leberschädigung [4].

1.2 Problembereiche für neue Verfahren in der Tumortherapie

Obwohl gerade im Bereich der operativen Verfahren, der Chemo- und Strahlentherapie in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, konnte dabei die Krebsmortalität kaum gesenkt werden. Die limitierenden Faktoren der nicht operativen Verfahren hängen zum einen stark von der Art des Tumors und zum anderen von den Eigenschaften des Wirkstoffes ab. Einer effektiven Behandlung stehen meistens die Tumormorphologie, physiologische und biochemische Barrieren im Weg.

1.2.1 Tumorstruktur und Physiologie

Die Morphologie von soliden Tumoren stellt eines der Hauptprobleme bei der gleichmäßigen Wirkstoffverteilung dar. In Tumoren gibt es in der Regel keine adäquate Perfusion. Sie bilden Nester von neoplastischen Zellen, die mit dem umgebenden Bindegewebe (Stroma) verwachsen sind, das bis zu 90 % des Tumors ausmacht [5]. Dieses Bindegewebe spielt eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Blutgefäßen, die für das Wachstum des soliden Tumors notwendig sind [6] und deren Neubildung häufig durch Wachstumsfaktoren gesteuert wird [7,8]. Daraus entstehen einerseits stark proliferierende Bereiche mit starker Durchblutung und andererseits schlecht durchblutete Bereiche, die schon fast nekrotisch erscheinen.

Eine Barriere für einen möglichen Wirkstoff stellt zudem der Transport in die Tumorzwischenräume (Intestitium) durch die Wand aus Blutgefäßen dar. In normalen Geweben stellt hier die Endothelschicht einen Schutzmechanismus gegen fast alle kleinen und großen Moleküle dar, der in Tumoren nur unvollständig funktioniert. Dies sollte die Aufnahme von Molekülen in das Intestitium erleichtern. Aber die Gesetze der

Hydrodynamik und des Transportes der Substanzen in solide Tumoren wirken einer erfolgreichen Aufnahme von Wirkstoffen in das Tumorzentrum entgegen. Dies ist hauptsächlich auf den hohen hydrostatischen Druckgradienten zwischen vaskulären Teilen und dem Intestitium zurückzuführen. Dieser Gradient führt zu einem Fluss weg vom Zentrum hin zu den peripheren Regionen des Tumors. Aus diesem Grund gelangen nur kleine Mengen der Wirkstoffe in das Zentrum des Tumors.

1.2.2 Zelluläre und biochemische Barrieren

Hat ein Wirkstoff das Intestitium eines Tumors erreicht, stellt die Zellmembran die nächste Barriere für eine erfolgreiche Aufnahme in die Zelle dar. Obwohl die Mehrheit der Wirkstoffe durch passive Diffusion aufgenommen werden kann, werden einige auch aktiv in die Zelle transportiert. Es gibt allerdings einige Chemotherapeutika, die durch Membranproteine, die als energieabhängige Pumpen fungieren, wieder aktiv aus der Zelle heraustransportiert werden. Als Beispiele sind hier P-Glycoprotein (P-gp) [9] ebenso wie das *multi drug resistance related protein* (MDRP) [10] und das *lung resistance protein* (LRP) [11,12] zu nennen. Diese Proteine arbeiten entweder alleine oder zusammen, und dieses Phänomen ist als *multi drug resistance* (MDR) bekannt.

Von den häufig verwendeten Zytostatika sind von der MDR vor allem die Anthracycline (Doxorubicin und Daunorubicin), Vinka-Alkaloide (Vincristin, Vinblastin) und die Taxane (Paclitaxel) betroffen. Aber auch andere Mechanismen im Cytoplasma können zur Detoxifizierung führen. Hier wären Glutathion und die Glutathion-S-Transferase zu nennen. Und auch auf Kernebene gibt es Proteine, die die Zelle vor dem Schaden der Chemotherapie schützen. Ziel einiger Substanzen ist die Topoisomerase 1 (Topotecan, Irinotecan) [13], die Topoisomerase 2 (Etoposid, Doxorubicin) oder die O-Methyltransferase (Platinium). Ein erhöhter Level an Enzymen des DNA-Reparatursystems könnte hier die Ursache für mögliche Resistenzen sein.

1.3 Strategien zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen in Tumorzellen

Um die Gabe von hohen Dosen Chemotherapeutika zu verhindern und normale Gewebe zu schützen, versucht man aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit inzwischen vermehrt, Zytostatika so zu verändern oder zu applizieren, dass sie selektiv nur im Tumorgewebe zur Wirkung kommen. Die direkte Applikation des Wirkstoffes (lokoregionale Applikation) mit konventionellen Zytostatika ist schon heute unter Berücksichtigung der allgemeinen Kriterien eines Patienten immer dann angezeigt, wenn mit ihr im Tumorgewebe eine höhere Wirkstoffkonzentration erzielt wird.

In neuen Therapieansätzen wird versucht inaktive Proformen (*Prodrugs*) zu verwenden, die gezielt im Gewebe durch exogene Faktoren wie Licht, Chemikalien, oder endogene Enzyme aktiviert werden können. Beispiele für die enzymatische Aktivierung stellen die mit Spacersequenzen modifizierte, etwa 200fach weniger aktive Anthracycline wie Doxorubicin glucuronid dar [14]. In Krebszellen überexprimierte β -Glucuronidase spaltet diese Sequenz ab und aktiviert das Zytostatikum direkt im Tumorgewebe [14,15]. Ein anderes Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Capecitabine (Xeloda[®]) [16], der gegen metastasierenden Brust- und Dickdarmkrebs eingesetzt wird. Seine Aktivierung verläuft über eine Kaskade von Spaltreaktionen, einerseits in der Leber durch Carboxyesterasen, andererseits im Tumor durch Thyminphosphorylasen.

Andere Ansätze gehen von einer Erhöhung der Spezifität und Effizienz aus. Eine Möglichkeit hierfür ist die gezielte Anreicherung der Wirkstoffe in der Tumorzelle, ein Prozess der als *drug targeting* bezeichnet wird. Hierzu wurden in den letzten 25 Jahren Strategien entwickelt, die Wirkstoffe mit Hilfe unterschiedlicher Träger (Vektoren) an ihre Zielorte zu bringen. Diese richten sich maßgeblich nach der Art des Wirkstoffes und der Zielzelle. Eine Hauptgruppe bilden hier die löslichen Träger, die sich aus monoklonalen Antikörpern und ihren Fragmenten, modifizierten Plasmaproteinen, Peptiden, Polysacchariden und organischen Polymeren zusammensetzen und in den Abschnitten 1.4 bis 1.5 genauer beschrieben werden. Man unterscheidet weiter einerseits partikuläre Träger wie Liposomen, Lipidpartikel, Nanopartikel und polymere Mizellen und andererseits zelluläre Träger wie antigenspezifische T-Lymphozyten.

- Die Liposomen bilden die wichtigste Gruppe der partikulären Träger. Es sind kleine Vesikel, die aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehen und in deren Mitte sich ein wässriges Kompartiment befindet. Ihre Größe variiert zwischen 20 und 10 000 nm. Aufgrund der unzureichenden Barrierenfunktion der Endothelschicht können große Moleküle durch den EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention) in das Tumorgewebe einwandern und dort den Arzneistoff lokal begrenzt freisetzen [17]. Der Vorteil von diesen Trägern ist, dass sie nicht giftig, nicht immunogen und biodegradierbar sind [17]. Beispiele hierfür sind Doxil (Caelyx[®]) gegen Prostatakrebs, metastatische Sarkome und Lungenkrebs [18-20], sowie Evacet (Myocet[®]) gegen metastasierenden Brustkrebs, die ihre Wirkung über die Doxorubicinfreisetzung entfalten.
- Als zelluläre Träger für das *drug targeting* dienen beispielsweise antigenspezifische T-Lymphozyten. Diese können zuvor *ex vivo* mit Genen für antiangiogenetische Proteine oder Toxine transfiziert werden. So wurden bereits CD8-positive T-Zellen mit einem Fusionsprotein bestehend aus Interleukin-4 und Diph-

theria-Toxin (DT), transfiziert. Die so behandelten T-Zellen führten nach intravenöser Injektion zu einer signifikanten Reduzierung des Tumorwachstums [21].

Für das *drug targeting* können auch die Eigenschaften der Tumorzellen ausgenutzt werden. Häufig überexprimieren Krebszellen tumorspezifische Antigene, Zuckerstrukturen oder Wachstumsfaktorrezeptoren an ihrer Oberfläche. Bei der Verwendung von Arzneistoffen, die an Vektormoleküle mit einer spezifischen Affinität zu diesen Strukturen gekoppelt sind, kommt es zu einem spezifischen Transport des Konjugates zum Zielorgan und somit zu einer Anreicherung des Arzneistoffes. Als Vektormoleküle eignen sich vor allem Antikörper und deren Fragmente, Cytokine, Hormone, Lectine und unterschiedliche Zuckerstrukturen.

1.4 Immunokonjugate

Die Idee, Antikörper gegen Krebs einzusetzen, ist schon sehr alt, bereits Paul Ehrlich machte um 1900 Vorschläge bezüglich einer spezifischen Therapie von malignen Tumoren mit Hilfe des Immunsystems [22]. Ermöglicht wurde dies erst durch die molekulare Charakterisierung von Immunglobulinen [23] und die Erfindung der Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper im Jahre 1975 [24]. Aufgrund ihrer hohen Spezifität werden sie als gutes Mittel gegen Krebs angesehen. Eingesetzt werden Antikörper dabei entweder vollständig, humanisiert, als Fragmente oder in rekombinanter Form (Abbildung 1).

Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg einer antikörperbasierenden Therapie sind die Spezifität und Verfügbarkeit der auf Tumorzellen exprimiert vorliegenden antigenen Epitope. Inzwischen wurden viele solcher tumorassoziierten Antigene (TAA) identifiziert. Generell gelten für sie folgende Parameter.

- Die Expression des Antigens sollte homogen auf der Tumoroberfläche verteilt und in für eine effektive Bindung ausreichender Menge vorhanden sein.
- Die Expression sollte in normalen Geweben limitiert oder nicht zugänglich sein.
- Die Antigene sollten membrangebunden sein und nicht durch Proteasen von der Zelloberfläche abgeschnitten werden.

So werden die epidermalen Wachstumsfaktoren c-erbB-1 (oder HER1) und c-erbB-2 (oder HER2), der Folatrezeptor oder das folatbindende Protein (FBP) und das epidermale Glycoprotein-2 (EGP-2) verwendet [25]. Eine Anzahl von präklinischen und klinischen Studien verwendet den Folatrezeptor als Tumormarker zur Behandlung von

Ovarienkrebs [26,27]. Weitere krebszellspezifische Antigene sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

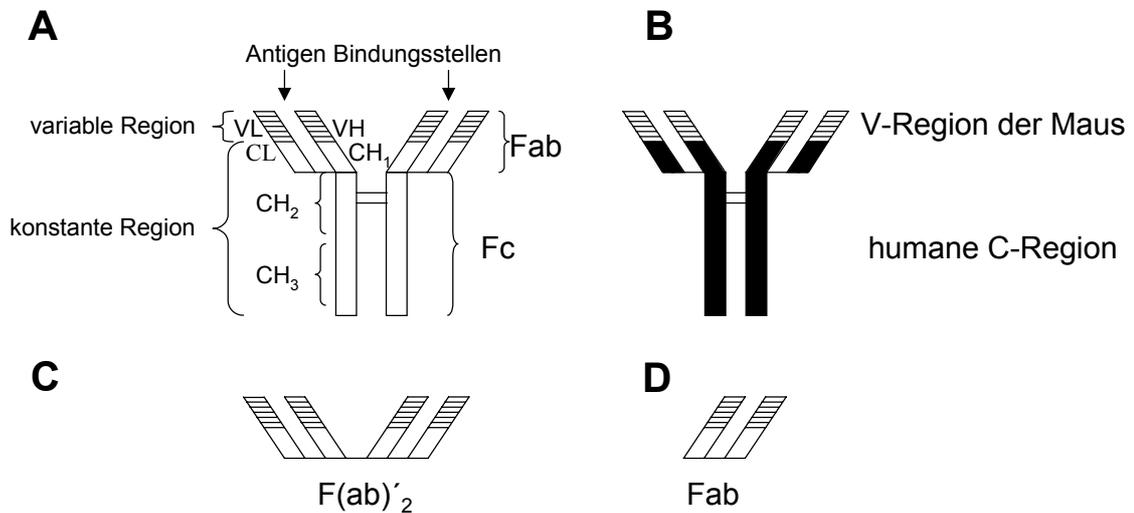


Abbildung 1: Schematische Darstellung der für die Krebstherapie eingesetzten monoklonalen Antikörper und ihrer Fragmente. (A) Murines IgG-Molekül bestehend aus zwei schweren (H) und zwei leichten Ketten (L). Die schweren und leichten Ketten sind jeweils durch eine Disulfidbindung zwischen CH₁ und CL verbunden. Die schweren Ketten sind zudem durch zwei weitere Disulfidbindungen zwischen den CH₂-Bereichen miteinander verknüpft. (B) Chimärer Antikörper bestehend aus den humanen konstanten Regionen und den variablen Regionen der Maus. (C) Das F(ab)₂-Fragment entsteht durch die Pepsinspaltung von IgG-Molekülen, das Fab-Fragment (D) durch Papainverdau.

1.4.1 Unkonjugierte Antikörper

Die Wirkung der unkonjugierten Antikörper geht aus mehreren Faktoren hervor. Bei der antikörperabhängigen, zellulären Cytotoxizität (ADCC) beruht der therapeutische Effekt auf der Erkennung des F_c-Teils von dem an die Tumorzelle gebundenen Antikörper durch Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten. Bereits Anwendung findet hier Pavilizumab (Synagis[®]), das sich gegen ein Epitop auf der Oberfläche vom *Respiratory-Syncytial-Virus* richtet und prophylaktisch bei besonders gefährdeten Kindern mit dieser Infektion eingesetzt wird. Noch in der Zulassung befindet sich Alemtuzumab (Campath[®]) gegen CD52 bei chronischer lymphatischer Leukämie. Einige monoklonale Antikörper sind in der Lage, in den Tumorzellen einen *cell cycle arrest* (CCA) auszulösen, was bei Antikörpern gegen den FAS-Rezeptor gezeigt werden konnte [28,29]. Neuere Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der Krebszellen führten zur Verwendung von monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen potentielle Moleküle, die an der Regulation beteiligt sind. So führen MAbs, die gegen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren gerichtet sind, ebenfalls zu Antitumoraktivität. Zu

nennen sind hier Infliximab (Remicade[®]), das gegen TNF α gerichtet ist und bei Rheumatischer Arthritis angewendet wird [28,30,31], Rituximab (Mabthera[®]), das durch Antikörperbindung gegen das CD20-Antigen zu einer Veränderung in der Zellregulation und schließlich zur Apoptose führt und bei therapierefraktären folliculären Lymphomen der Stadien III–IV Anwendung findet [32,33] und Trastuzumab (Herceptin[®]), das gegen den HER-Rezeptor gerichtet ist und bei Brustkrebs eingesetzt wird [34].

Tabelle 1: Übersicht bekannter krebszellspezifischer Antigene ^a

Krebsart	Antigen
Non-Hodgkin's Lymphoma NHL	CD19, CD20, CD22, CD52
Chronische lymphoblastische Leukämie (CLL)	CD5
Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)	CD33, CD45
Akute myeloide Leukämie (AML)	CD10, CD25
T-Zellen ALL	CD25, CD5, CD7
T-Zell-Lymphoma	CD4, CD5
kolorektales Karzinom	CEA, CO17-1A
Melanoma	p240, p97, GD2 GD3
Mammakarzinom	HER-2/neu, LewisY
Prostatakarzinom	PSA, EGFR
Ovariakarzinom	LG6
Bronchialkarzinom	EGFR, BLP
Glioma	EGFR

^aaus Kosterink *et al.* [35]

1.4.2 Bispezifische Antikörper

Für den therapeutischen Einsatz werden nicht nur unkonjugierte Antikörper verwendet, sondern auch Konjugate, die aus verschiedenen Antikörpern zusammengesetzt sind. Diese bispezifischen Antikörper (BsMAbs) finden in ersten Therapien Anwendung. Sie beruhen auf der gleichzeitigen Bindung einer Krebszelle und einer immunologischen Effektorzelle (Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten) und führen dadurch zur Zerstörung der Tumorzelle [36]. Die Herstellung solcher Moleküle mit zwei verschiedenen Antigenbindungsstellen war – vor dem Aufkommen rekombinanter Techniken – extrem aufwendig, was ihre Weiterentwicklung zunächst stark einschränkte. Inzwischen gibt es einige vielversprechende klinische Studien der Phase I und II zu diesem Konzept [37].

1.4.3 Antikörperkonjugate kleiner cytotoxischer Wirkstoffe

Ebenfalls vielversprechend ist die Konjugation von niedermolekularen cytotoxischen Wirkstoffen an Antikörper. Dies können Zytostatika oder Radionuklide sein. In Radioimmunokonjugaten werden hauptsächlich die β -Emitter ^{131}Iod , $^{90}\text{Yttrium}$, $^{88}\text{Rhenium}$, aber auch die α -Emitter $^{211}\text{Astatin}$ und $^{212}\text{Wismut}$ verwendet.

Die Zytostatika-Immunokonjugate zeichnen sich im Gegensatz zu den bloßen Zytostatika durch eine verringerte Toxizität gegenüber den normalen Zellen aus. Konventionelle Zytostatika wie Doxorubicin, Idarubicin, Methothrexat, Chlarambucil, Vinka-Alkaloide und Mitimycin-C wurden bereits als solche Konjugate untersucht [38-40]. Diese Konjugate können direkt kovalent oder über Spacersequenzen und Moleküle wie Dextran, humanes Serumalbumin oder Amino-Dextran verbunden sein. Die Aufnahme der Wirkstoffe kann entweder durch Internalisierung des gesamten Konjugates erfolgen, durch extrazelluläre Freisetzung und nachfolgende Diffusion oder aktiven Transport in die Krebszelle. Für die Freisetzung spielt die Wahl des Linkers eine entscheidende Rolle. Peptidische Linker nutzen die Aktivität spezifischer Peptidasen oder Esterasen. Die hydrolytisch labile Bindung wird im sauren Endosom gespalten. Beispiele hierfür sind cis-Aconityl-Linker [41,42], Acylhydrazone, Oxime [43] und Phosphamide [44]. Eine weitere Möglichkeit der Bindung stellt die Disulfidbrücke dar. Diese findet gerade bei solchen Stoffen Anwendung, die natürlicherweise über freie Thiolgruppen verfügen wie Colchizin und Methotrexat [45-48]. Nachteilig ist hier die starke Instabilität dieser Bindung im Blutstrom [49], die inzwischen durch sterische Hinderung verringert werden konnte [50,51]. Neben der intrazellulären spielt auch die extrazelluläre Freisetzung, die bei schlecht durchbluteten Tumoren von Vorteil ist, eine Rolle. Die Freisetzung kann hier über an der Tumoroberfläche exprimierte Enzyme stattfinden. Beschrieben sind Spacersequenzen, die durch Cathepsine, Collagenasen oder Plasminogenaktivatoren an der Zelloberfläche gespalten werden [52].

In den USA ist mit Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg[®]) bereits ein Wirkstoff dieser Substanzklasse zugelassen. Gemtuzumab ist ein humanisierter Antikörper, der gegen das bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie vermehrt exprimierte CD33-Antigen gerichtet ist. Bei Ozogamicin (Calicheamicin) handelt es sich um ein antitumoral wirksames Antibiotikum natürlichen Ursprungs. Das Kopplungsverhältnis beträgt circa 1:2-3, wobei die Bindung über einen Linker erfolgt, der einerseits eine durch zwei Methylgruppen sterisch geschützte Disulfid- und andererseits eine Acylhydrazongruppe enthält [53].

1.5 Immunotoxine

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Zytostatika-Immunkonjugaten macht man sich in Immunotoxinen gezielt das hohe cytotoxische Potential von natürlichen Toxinen zunutze, die ähnlich wie die *Prodrugs* ihre Wirkung erst im Zellinneren entfalten können. Den Wirkungsmechanismus stellt man sich dabei so vor, dass das Konstrukt nach Antigenbindung zunächst über endocytotische Prozesse internalisiert wird. Anschließend gelangt nur der Toxinanteil aus den Endosomen ins Zellinnere und vermittelt die Cytotoxizität.

Immunotoxine, die durch ihren zelltypspezifischen Liganden zu den Tumorzellen geführt werden, unterscheiden sich in ihrem Mechanismus grundlegend von chemotherapeutischen Substanzen [4]. Faktoren wie MDR, die die Krebszellen resistent gegen viele Chemotherapien machen, haben keinen Einfluss auf die in Immunotoxinen verwendeten Toxine. Eine entscheidende Rolle spielt die Potenz der verwendeten Toxine gerade in soliden Tumoren, die aufgrund des interstitiellen Drucks nur sehr geringe Mengen an Wirkstoff aufnehmen. Für die meisten Chemotherapeutika werden etwa 10^4 – 10^5 Moleküle benötigt, um eine Tumorzelle zu töten. Anders verhält es sich bei den natürlichen Toxinen, die enzymatisch wirken. So reichen je nach Art des verwendeten Toxins wenige Moleküle zum Abtöten einer Krebszelle aus [54].

Neben der Tumorthherapie zeigen sich aber auch andere Anwendungsmöglichkeiten für die Immunotoxine, wie die Behandlung von Infektionen mit dem *Human-Immuno-deficiency-Virus* (HI-Virus) [55]. Zum Einsatz bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie z. B. rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus Typ I und Psoriasis laufen bereits Phase I und II Studien [56].

1.5.1 Toxine

Die bei Immunotoxinen bisher eingesetzten Toxine lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen: Proteintoxine, peptidische Toxine sowie nicht peptidische Toxine. Die nicht peptidischen Toxine sind häufig Derivate kleiner zellulärer Moleküle, die eine Rolle in der Signaltransduktion (8-Chloro-cAMP, Trimethylsphingosin 75 [57,58]) oder der Proteinbiosynthese (5-Fluorouridin [59,60]) spielen.

Neurotoxische Peptide (z. B. μ - und ω -Conotoxine oder Apamin) finden sich bei vielen giftproduzierenden Tieren wie z. B. Schlangen. Aber auch aus humanen Proteinen konnten toxische Peptide abgeleitet werden, so zwei antiproliferativ wirkende kurze Peptide aus dem Tumorsuppressor p21(WAF1) [61]. Oftmals enthalten peptidische Toxine zusätzlich seltene Aminosäuren wie die D-Isomere der DNA-codierten

Aminosäuren und sind häufig zyklisiert. Typische Beispiele sind das aus dem Pilz *Amanita phalloides* stammende zyklische Oktapeptid Amanitin und aus Cyanobakterien stammende, zyklische Heptapeptide, die Microcystine.

Die Proteintoxine lassen sich aufgrund ihrer Wirkungsweise in eine Vielzahl von Untergruppen einteilen, u. a. in Toxine, die Membranen permeabilisieren (z. B. Streptolysin), den Membrantransport inhibieren (z. B. Tetanustoxin), auf Ionenkanäle wirken (z. B. Dendrotoxine), die Signaltransduktion beeinflussen (z. B. Cholera toxin) und die Proteinbiosynthese inhibieren. Letztere haben sich für Immunotoxine als besonders geeignet erwiesen, da sie erst intrazellulär wirken und den Zelltod fördern. Diese Toxine lassen sich entsprechend ihrem Katalysemechanismus in drei Klassen unterteilen. Die erste Klasse beinhaltet ADP-ribosylierende Enzyme, die den eukaryotischen Elongationsfaktor EF-2 am Diphthamid-715 (einem Histidin-Derivat) modifizieren, z.B. Diphtheriatoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin [62-65]. Die zweite Klasse stellen Endonukleasen dar, die die Phosphodiesterbindung 3'-seitig von Guanosin-4325 der eukaryotischen 28S-rRNA (oder 3'-seitig von Guanosin-2661 der prokaryotischen 23S-rRNA [66] schneiden, wie z. B. α -Sarcin [57]. Die dritte Klasse umfasst die N-Glycosidasen, die das Adenin-4324 der 28S-rRNA abspalten [4,67-69], z. B. die Typ 2-RIPs (s. u.) Ricin und Abrin oder die Typ 1-RIPs *Pokeweed* antiviral Protein, Dianthin, Gelonin, Saporin und Moddeccin [4,68,70,71].

Proteintoxine, die die Proteinsynthese hemmen, weisen unabhängig von ihren strukturellen Domänen für alle oben aufgeführten Klassen drei funktionelle Domänen auf, eine Zellerkennungsdomäne, eine Translokationsdomäne und eine katalytische Domäne [72]. Um zu verhindern, dass auch normal differenzierte Zellen durch die Zellerkennungsdomäne des Toxins erkannt werden, ist es notwendig, diese Domäne zu identifizieren und vom restlichen Protein abzutrennen. Während sich dies bei Toxinen aus nur einer Polypeptidkette wie bei Sarcin schwierig gestaltet, kann bei der Klasse der pflanzlichen N-Glycosidasen, die aus zwei über eine Disulfidbrücke verknüpften Polypeptidketten bestehen (Typ 2-RIPs), die für die Zellerkennung verantwortliche B-Kette mit relativ geringem Aufwand entfernt werden.

Neben zahlreichen anderen RIPs ist auch für den wohl bekanntesten Vertreter der pflanzlichen N-Glycosidasen, dem Ricin, die cDNA der katalytischen Domäne, der A-Kette, kloniert [73], so dass eine biochemische Reinigung der A-Kette aus dem nativen Toxin umgangen werden kann. Ebenfalls von Bedeutung ist die Entdeckung der Typ 1-RIPs. Diese Toxine bestehen nur aus der A-Kette und sind wegen der fehlenden Zellerkennungsdomäne *in vivo* nur gering toxisch. Ihre Fähigkeit, die Proteinsynthese *in vitro* zu inhibieren, ist jedoch uneingeschränkt groß [72], so dass sie als Toxine im *drug*

targeting besonders gut geeignet erscheinen. Klionierte Vertreter der Typ 1-RIPs sind unter anderem Gelonin, Saporin und Dianthin [74-76].

Die Möglichkeit, Immunotoxine molekularbiologisch rekombinant herzustellen, ermöglicht es, die Toxine direkt mit ihren Liganden, wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder klonierten variablen Bereichen von Antikörpern zu verbinden.

Voraussetzung für die Anwendung dieser Konstrukte ist aber, dass funktionierende *in vitro*-Testsysteme die Aktivität der so hergestellten Fusionstoxine bestätigen. Die Aktivität der Bakterientoxine PE und DT wird über die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor II (EF II) bestimmt [77]. Im Westernblot kann der mit biotinyliertem NAD⁺ ribosylierte EF II mittels Antikörper gegen Biotin detektiert und so die Aktivität der Toxine als Umsatz von NAD⁺ gemessen werden.

Ein anderer Assay, der auf alle die Proteinbiosynthese hemmenden Toxine (DT, PE und RIPs) angewendet werden kann, ist der *in vitro*-Translationsassay. Hier wird in einem Retikulozytenextrakt die Inhibierung der Translation gemessen. Durch Verwendung der radioaktiv markierten Aminosäuren [¹⁴C]-Leucin oder [³⁵S]-Methionin kann anhand der eingebauten Radioaktivität indirekt die Stoffwechselaktivität bestimmt werden [78,79].

Zum Nachweis der Aktivität der RIPs gibt es eine Vielzahl an Assays, die die N-Glycosidaseaktivität dieser Enzyme ausnutzen. Ein Verfahren nach Brigotti *et al.* [80] misst die Freisetzung von radioaktivem Adenin aus zuvor mittels PCR radioaktiv markierter DNA. Ein anderes Verfahren zur direkten Detektion von Adenin basiert auf der Markierung des freiwerdenden Adenins mit Chlor- oder Bromacetaldehyd zu einer fluoreszierenden Verbindung, die mittels HPLC aufgetrennt und durch interne Standards quantifiziert werden kann [81-83]. Allen Methoden gemeinsam ist, dass sie entweder kompliziert und zeitaufwendig sind, nur eine semiquantitative Bestimmung der Enzymaktivität ermöglichen oder eine sehr aufwendige apparative Einrichtung erfordern.

1.5.2 Liganden

Die Wahl des Liganden ist extrem wichtig für den Aufbau eines Immunotoxins. Seine Spezifität trägt in gleichem Maße zur Funktion des Konstruktes bei wie das gewählte Toxin. Um effektiv wirken zu können, muss die Toxinkomponente der Immunotoxine in das Cytosol gelangen. Da diese jedoch nicht selbständig in die Zelle diffundieren oder wie Radionuklide ihre Wirkung auch von außerhalb auf die Zelle ausüben kann, muss in diesem Fall der gesamte Ligand-Antigenkomplex internalisiert werden.

Anfänglich wurden Immunotoxine aus vollständigen, monoklonalen Antikörpern und Pflanzen- oder Bakterientoxinen über chemische Konjugation hergestellt. Diese zeigten zwar bereits in der Zellkultur ein deutlich höheres cytotoxisches Potential als andere bekannte Zytostatika, erwiesen sich aber in den ersten klinischen Studien aufgrund ungenügender Tumorpenetration und starker systemischer Nebenwirkungen als ungeeignet [84,85]. Die Gründe hierfür lagen bei der hohen Antigenität der einzelnen Komponenten, die sowohl von den verwendeten Toxinen, aber auch von Seiten der monoklonalen murinen Antikörper (MAbs) herrührte. Zur Verringerung dieser Immunogenität der MAbs wurden diese im Laufe der Weiterentwicklung durch humanisierte Antikörper (siehe Abbildung 1) ersetzt [86].

Weitere Verbesserungen konnten mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie erzielt werden. Diese ermöglichte es, kleine antikörperbasierte Moleküle, die einzelkettigen Fv-Fragmente (*single chain* scFv) darzustellen [87]. Aufgrund ihrer relativ geringen Größe (etwa 26 kDa) führte die Veränderung zu einer signifikanten Verbesserung der Tumorpenetration *in vivo* [88]. Die Verwendung der rekombinanten DNA-Technologie hatte zudem den Vorteil, die bislang aufwendige Produktion von chemisch gekoppelten Immunokonjugaten stark zu vereinfachen.

Ein alternatives Konzept für die Entwicklung der Immunotoxine stellte die Verwendung von humanen, tumorspezifischen Liganden dar. (Diese in der Literatur auch als Cytotoxine beschriebenen Fusionstoxine werden im Rahmen dieser Arbeit weiter als Immunotoxine bezeichnet.) Mit diesen Liganden war es ebenfalls möglich, eine verbesserte Tumorpenetration aufgrund ihrer Größe zu erreichen. So sind Transferrin (Tf, 80 kDa), Interleukin 2 (IL 2, 15 kDa) und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, 6 kDa), die hier beispielhaft erwähnt sind, wesentlich kleiner als ein Antikörper von etwa 150 kDa. Gleichfalls wie die Antikörper binden die Liganden an die entsprechenden Rezeptoren auf der Tumorzelle.

Hervorzuheben ist hier die Familie der EGFR. Sie bildet den Kopf einer komplexen Signaltransduktionskaskade, die die Zellproliferation, Adhäsion, Migration und die Differenzierung der Zellen steuert. Eine aberrante Aktivität von Mitgliedern dieser Rezeptorfamilie spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung und dem Wachstum von Tumorzellen.

Bis heute sind vier humane Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER1–4) bekannt. Nach der Bindung des Liganden an den extrazellulären Teil eines dieser Rezeptoren kommt es entweder zu einer Homo- oder einer Heterodimerisierung der Rezeptoren [89]. Nachfolgend wird der intrazelluläre Teil phosphoryliert und die Tyrosinkinasedomäne

aktiviert, die die intrazellulären Signalwege in Gang setzt. Das Rezeptordimer wird im Anschluss über clathrinvermittelte Endocytose in die Zelle internalisiert. Im Falle eines HER1-Homodimers kommt es nachfolgend zu einem Abbau in den Lysosomen, bei Heterodimeren aus HER1 und HER2 wird hingegen ein Recyclingweg eingeschlagen [90]. Viele Liganden sind inzwischen für diese Rezeptoren beschrieben, Tabelle 2 zeigt eine Übersicht.

Tabelle 2: Rezeptoren der HER-Familie und ihre Liganden

Rezeptor-Subtyp	Liganden
HER1	EGF ^a , TGF- α ^b , Amphiregulin, beta-Cellulin HB-EGF ^c
HER2	
HER3	Heregulin
HER4	Neuregulin 2, Neuregulin 3, Heregulin, beta-Cellulin.

^a epidermal growth factor, ^b transforming growth factor, ^c heparinbindendes EGF,

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass fehlregulierte Signale dieser Rezeptoren eine mögliche Ursache bei vielen Krebsleiden sind [91]. Dies kann durch die Überexpression des Rezeptors, eine Überproduktion der HER-Liganden wie z. B. TGF- α innerhalb einer autokrinen Schleife [92,93] oder eine permanente Aktivität des Rezeptors hervorgerufen werden [94]. So wurde beispielsweise eine Überexpression von HER1 bei fast allen Kopf- und Halstumoren, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, Prostatakrebs, kolorektalem Karzinom, Brust- und Eierstockkrebs nachgewiesen [91,95,96]. Diese Überexpression der Rezeptoren im Tumorgewebe spielt für die Verwendung der Immunotoxine eine entscheidende Rolle.

1.6 Aktuelle Entwicklung von Immunotoxinen

In den letzten Jahren sind einige Immunotoxine in klinischen Studien der Phasen I–III getestet worden. Bereits im Jahre 1999 bekam ein Immunotoxin aufgrund der sehr hohen Remissionsraten in einer klinischen Studie der Phase III (Remissionen in 22 von 71 Fällen, circa 30 %) [97] als erster Vertreter dieser neuen Substanzklasse die Zulassung in den USA. Damit steht DAB₃₈₉IL 2 (Wirkstoffname: Denileukin Diftitox, Handelsname: Ontak[®]) nun offiziell als neues Therapiekonzept und als erstes Immunotoxin zur Behandlung von therapierefraktären Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom (mit mehr als 20 % CD25-positiven Lymphozyten) zur Verfügung.

In einer Phase I/II Studie mit 15 Patienten mit malignen Gehirntumoren wurde die an Transferrin gekoppelte katalytische Domäne von DT (Tfn-CRM107) erfolgreich eingesetzt. Hierbei gelang es, die physiologischen Barrieren mittels Mikroinfusionen zu umgehen. Eine 50 %ige Reduzierung der Tumorgroße wurde bei 60 % der Patienten

erreicht. Bei zwei Patienten konnte sofort eine komplette Remission erreicht werden [98]. In Mausmodellen wurde das Immunotoxin 425.3-PE bestehend aus einem Mab gegen HER1 und der A-Kette aus PE untersucht. Dieses zeigte im direkten Vergleich sogar noch bessere Wirksamkeit als das bereits in klinischen Studien untersuchte Tfn-CRM107 [99]. Ebenfalls vielversprechend ist das Immunotoxin BL22. Dieses besteht aus dem dsFv-Teil eines anti-CD22-Mab und der katalytischen Domäne von PE. Von 16 untersuchten Patienten mit einer gegen die üblichen Chemotherapeutika resistenten Form von Haarzelleukämie zeigten 11 eine vollständige und 2 eine partielle Remission des Tumors [100]. Eine Auswahl der sich in Phasen der klinischen Testung befindlichen Immunotoxine ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Ausgewählte Immunotoxine in klinischen Studien (Phase I–III)

Bezeichnung	Toxin	Ligand	Antigen	Indikation	Ref.
DAB389IL 2	DT	IL 2	IL 2-R	kutanes T-Zell-Lymphom	[97]
LMB-2	PE	Anti-Tac scFv	CD25	Haarzelleukämie	[101]
Anti-B4–bR	RT	Anti-B4 Mab	CD19	Non-Hodgkin-Lymphome	[102]
Ki-4.dgA	RT	Anti Ki-4 Mab	CD30	Hodgkin-Lymphome	[103]
RFT5-dgA	RT	Anti RFT5 Mab	CD25	Hodgkin-Lymphome	[104]
BL 22	PE	RFB4 dsFv	CD22	Haarzelleukämie	[100]

1.7 Therapeutische Grenzen der Immunotoxine

Trotz der ersten, möglicherweise bahnbrechenden Erfolge in der Therapie mit Immunotoxinen gilt es noch immer, eine Reihe von kritischen Faktoren zu überwinden, die eine ausgedehntere Anwendung dieser Substanzen bislang einschränken:

- Tumorpenetration: Ein großes Problem bei der Anwendung von Immunotoxinen stellt die schlechte Tumorpenetration dar. Dies betrifft sowohl konventionelle Immunotoxine (chemisch gekoppelte Mab) [105] als auch in geringerem Maße die rekombinanten Immunotoxine.
- Systemische Effekte: Aufgrund des hohen immunogenen Potentials der Toxin-komponente, aber auch des Liganden kommt es verstärkt zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern.
- Unspezifische Toxizität: Einerseits kann die Antigen-spezifität des Liganden oder die Tumorzellspezifität des Antigens nicht ausreichend sein, so dass es auch zur Schädigung von normal differenzierten Zellen kommt. Hauptsächlich

betroffen sind hiervon Leber und Niere. Andererseits kommt es häufig bei der Gabe von Immunotoxinen zum *vascular leak syndrome* (VLS), einer Permeabilisierung der Endothelschicht, die u. a. zu pulmonalen Ödemen führt.

In Bezug auf die Tumorpenetration gelang es durch Variation und / oder Verkleinerung der zielzellerkennenden und der toxischen Komponenten beachtliche Verbesserungen zu erreichen [106,107]. Dennoch stehen aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit hauptsächlich hämatologische Tumoren im Mittelpunkt der Indikationsgebiete von systemisch applizierten Immunotoxinen.

Die bereits beschriebenen Eigenschaften, die heterologe Durchblutung und der hohe interstitielle Druck von soliden Tumoren, die mit circa 85 % den Hauptteil aller Krebsleiden darstellen [108], erschweren die Anwendung von Immunotoxinen erheblich [109]. Selbst nach lokoregionaler Applikation ist die Verteilung von Arzneistoffen in solchen Geweben wenig effizient (5–10fach langsamer als bei einschichtigen Zellkulturen) [110], so dass bereits bei einer Tumorgröße von circa 10 mm die Penetrationsfähigkeit von Immunotoxinen zum limitierenden Faktor für die antitumorale Wirkung wird [111].

Trotzdem haben Immunotoxine gerade bei soliden Tumoren ein besonders gutes therapeutisches Potential. Während in den nekrotischen Teilen des Tumorgewebes viele konventionelle Chemotherapeutika unwirksam sind oder durch Resistenzen nicht zur vollständigen Wirkung kommen, wirken Immunotoxine aufgrund der Apoptose-Induktion auch gegen diese nekrotischen, ruhenden Zellen [112]. Auch gegenüber resistenten Tumorzellen zeigen sie Cytotoxizität [113-116]. Diese Vorteile werden in klinischen Studien durch die hohen Ansprechraten bei Patienten mit therapierefraktären Tumorarten eindrucksvoll bestätigt.

1.8 Verknüpfung von Toxin und Ligand

In Immunokonjugaten ist die Verknüpfung zwischen Vektormolekül und Arzneistoff von besonderer Bedeutung. Im Organismus muss sie einerseits über eine ausreichende Stabilität im Blutkreislauf verfügen, darf aber auch nicht zu stabil sein. Hier wurde beobachtet, dass eine kürzere Halbwertszeit der Immunotoxine die Entstehung von VLS verringert [100]. Andererseits muss eine spezifische, effiziente Freisetzung des Wirkstoffes an der Zielzelle gewährleistet sein. Hierfür werden mittlerweile überwiegend solche Verbindungen verwendet, die unter den in Endosomen und Lysosomen vorherrschenden oder unter reduzierenden Bedingungen gespalten werden.

1.8.1 Endosomal und lysosomal spaltbare Sequenzen

Grundsätzlich sind für die erforderlichen spaltbaren Einheiten der Immunotoxine chemische Crosslinker oder bei einer rekombinanten Synthese selektiv spaltbare Peptide einsetzbar. Chemische Bindungen, die unter den in den Endosomen vorherrschenden Bedingungen ein geeignetes Spaltungsverhalten zeigen, sind begrenzt verfügbar (Abschnitt 1.4.3., S. 8).

Neben der chemischen Kopplung kann die Verknüpfung auch auf molekularbiologischer Basis erfolgen. Für die Zusammensetzung eines endosomal spaltbaren Peptids liegt es nahe, sich der proteasespaltbaren Bereiche von PE und DT zu bedienen. Für die Spaltung innerhalb ihres proteasesensitiven Bereiches werden Furin oder furinähnliche Enzyme verantwortlich gemacht. In beiden Fällen ist jedoch die exakte zelluläre Lokalisation der Reaktion aufgrund der geringen Expressionsraten der beteiligten Enzyme nur sehr schwer zu klären [117]. Beide Bereiche wurden bereits unabhängig von ihren restlichen Toxinanteilen in Immunokonjugaten eingesetzt [118,119].

Als lysosomal spaltbares Peptid findet bereits in verschiedenen Immunokonjugaten die Sequenz Gly-Phe-Leu-Gly Anwendung, deren Spaltung möglicherweise durch Cathepsin D bedingt ist, welches zwischen zwei hydrophoben Aminosäuren schneidet [120,121]. Dieser Linker wurde in einem mit Doxorubicin beladenen HPMMA-Polymer (*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) bereits im Rahmen einer klinischen Studie der Phase I untersucht [122]. Alternativ wurde die Sequenz Gly-Phe-Ala-Leu für die Kopplung von Mitomycin C (MMC) an das lösliche Poly-[*N*-(2-hydroxyethyl)-L-glutamin] (pHEG)-Polymer verwendet [52,123].

1.8.2 Cytosolisch spaltbare Sequenzen

Für die Spaltung chemischer Linker bietet sich im Cytosol aufgrund des reduktiven Milieus eine Disulfidbindung an. Durch sterische Hinderung dieser Bindung lässt sich ein weites Spektrum unterschiedlicher Stabilitäten erreichen [51].

Da das Cytosol nur wenige proteolytisch aktive Enzyme enthält, die spezifische Erkennungsmotive nutzen und dabei nicht zur vollständigen Degradation der Proteine führen, ist es schwierig, eine peptidische Sequenz zu finden, die spezifisch im Cytosol gespalten wird.

Eine Ausnahme bilden hier die Caspasen. Es handelt sich hierbei um aspartatspezifische Cysteinproteasen, die ihre Substrate C-terminal einer bestimmten, vier Aminosäuren langen, auf Aspartat endenden Sequenz schneiden. Man unterscheidet zwei Subfamilien von Caspasen:

- Die ICE-Subfamilie (*interleukin-1-converting enzyme*), die während entzündlicher Reaktionen aktiv ist. Als Vertreter sind die Caspasen 1, 4, 5 und 13 zu nennen.
- Die CED-3-Subfamilie (definiert nach *C. elegans*), deren Vertreter im Rahmen der Apoptose aktiv werden und sich weiter in Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6, 7) und Aktivierungs-Caspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) unterteilen.

Alle Caspasen werden als inaktive Proformen [124] exprimiert und erst nach entsprechender Induktion (rezeptorvermittelt oder stressinduziert) durch Proteolyse aktiviert [125,126]. Obwohl sich die meisten Tumoren der Apoptose entziehen, konnte gezeigt werden, dass die Expressionsraten der Caspasen 1 und 3 in zahlreichen Tumoren (Pankreastumore, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome) erhöht sind [127,128]. Weiter wurde festgestellt, dass Immunotoxine neben ihrer Inhibierung der Proteinbiosynthese auch direkt oder indirekt in der Lage sind, Apoptose in den Tumorzellen auszulösen [129-132]. Eine mögliche im Cytosol spaltbare Peptidsequenz könnte somit aus verschiedenen Substraterkennungsmotiven unterschiedlicher Caspasen bestehen. Eine andere Sequenz, die im Cytosol gespalten werden könnte, ist das Tripeptid Arg-Gly-Pro. Für dieses Motiv konnte im Cytosol von Hefezellen indirekt eine Spaltung nachgewiesen werden. Auch wenn der Mechanismus bislang ungeklärt ist, besteht die Möglichkeit, dass das Motiv auch in humanen Zellen spaltbar ist [133,134].

1.8.3 Toxinunabhängiger Membrantransfer

Ein effizienter Transfer von Proteinen oder Nukleinsäuren als hochspezifische, intrazellulär aktive Agenzien durch zelluläre Membranen stellt eines der Hauptprobleme bei der Verwendung von Immunotoxinen für die Tumorthherapie dar. In den meisten Fällen werden wahrscheinlich die an den Rezeptor gebundenen Immunotoxine nach der Endocytose entweder wieder aus der Zelle herausgeführt oder in den Lysosomen abgebaut. Endosomen besitzen nach bisherigen Erkenntnissen keine effektiven transmembranären Translokationsmechanismen für Polypeptide wie Proteintoxine, die den Transfer der endocytierten Toxine aus dem Lumen der Endosomen in das Cytoplasma bewirken. Zwar sind im Unterschied zu Endosomen in der Membran des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (rER) mehrere Transportsysteme für Makromoleküle lokalisiert, u. a. ein Transportsystem für den retrograden Proteintransport sowie eines für die Translokation freier Oligosaccharide aus dem Lumen des ER ins Cytosol [135,136], jedoch existiert zur Zeit keine Möglichkeit, antikörpergebundene Toxine gezielt in diese Kompartimente zu lenken. Bei Immunotoxinen wurde häufig versucht, dieses Problem zu umgehen, indem neben der katalytischen

Domäne auch die toxineigene Translokationsdomäne verwendet wird. Dies grenzt aber auch die Auswahl möglicher Toxinkomponenten stark ein.

Dagegen sind in den letzten Jahren kurze Peptide charakterisiert worden, die biologische Membranen unspezifisch durchdringen und dabei auch andere Peptide oder kleine Proteine mit durch die Membran schleusen können. Diese sogenannten Trojanischen Peptide, die bis zu 30 Aminosäuren lang sind, stammen entweder von natürlichen Proteinen ab oder wurden im Labor synthetisch entwickelt [2,137-139]. Solche Peptide sind bereits erfolgreich eingesetzt worden, um unterschiedlich große Proteine in Zellen zu schleusen. Für eine Anwendung in Immunotoxinen sind vor allem solche Trojanischen Peptide interessant, deren Transportkapazität im Bereich von 20–30 kDa liegt. In Betracht kommen die Transferpeptide TLM, Tat und VP 22, für die jeweils ein Transfer von GFP (27 kDa) gezeigt werden konnte [3,140,141], ferner das Peptid MTS mit dem die Glutathion-S-Transferase (41 kDa) ins Zellinnere geschleust werden konnte [1]. Penetratin ist dagegen nur für Transporte kleinerer Proteine mit bis zu 100 Aminosäuren geeignet [2]. Bei allen Proteinen, die mittels dieser Trojanischen Peptide in die Zellen geschleust wurden, war kein negativer Einfluss auf ihre Funktionalität festzustellen [139]. In Tabelle 4 sind die unterschiedlichen Trojanischen Peptide nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4: Trojanische Peptide

Bezeichnung	Ursprung	Aminosäuresequenz	Ref.
Penetratin	Antennapedia-Transkriptionsfaktor, <i>Drosophila</i>	RQIKIWFQNRMRMKWKK	[2]
MTS	Kaposi-Fibroblastenwachstumsfaktor, human	AAVLLPVLLAAP	[142]
TLM	Oberflächenantigen, <i>Hepatitis-B-Virus</i>	PLSSIFSRIGDP	[143]
Tat	Transkriptionsaktivierender Faktor, HI-Virus, Typ 1	GRKKRRQRRRPPQ	[141, 144]
VP 22	Transkriptionsfaktor, <i>Herpes-Simplex-Virus</i> , Typ 1	DAATATRGRSAASRPTERP RAPARSASRPRRPVE	[141, 144]

Ein Model für den Wirkmechanismus dieser Peptide ist bislang nur für das Penetratin beschrieben. Hier wird davon ausgegangen, dass das Transferpeptid mit den negativ geladenen Phospholipiden der extrazellulären Membran interagiert. Dadurch wird die Lipiddoppelschicht destabilisiert und es bilden sich inverse Mizellen. Diese wandern durch die Membran und vermitteln somit den Transfer des Trojanischen Peptids ins Cytosol. Ein Transport in die umgekehrte Richtung ist ebenfalls denkbar.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die zahlreichen Therapieerfolge durch Immunotoxine mit unterschiedlichen Vektormolekülen zeigen, dass die Weiterentwicklung von Immunotoxinen ein wichtiger Bestandteil der Tumorthherapie ist. Trotzdem treten immer noch vermehrt Nebenwirkungen auf, die es zu minimieren gilt. Diese beruhen einerseits auf der Größe, andererseits dem immunogenen Potential und der Toxizität gegenüber gesunden Zellen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zur Optimierung der Immunotoxine einen universellen, molekularbiologisch hergestellten Adapter zu entwickeln, der zu einer effizienten Akkumulation des Proteintoxins im Cytosol der Zielzellen führt und zudem unerwünschte Nebenwirkungen vermindern soll, die bislang aufgrund von hoher Stabilität herkömmlicher Linker in Immunotoxinen im Rahmen der Tumorthherapie auftreten.

Der zu entwickelnde molekulare Adapter sollte aus insgesamt drei Teilen zusammengesetzt werden, einer Membrantransfersequenz, die von einer cytosolisch und einer endosomal spaltbaren Einheit flankiert wird und das Toxin mit dem Liganden verbindet (Aufbau und Funktionsweise siehe Abbildung 2). Als Proteintoxin sollte das ribosomeninaktivierende Protein Saporin, als tumorspezifischer Ligand der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), dessen Rezeptor bereits in Bezug auf seine Tumorexpression gut untersucht ist, verwendet werden. Weiter sollte versucht werden, die Größe des Saporins zum Zweck der verbesserten Tumorpenetration und eines verbesserten Membrantransfers mittels Mutagenese zu verringern. Da die Immunotoxine rekombinant hergestellt und modifiziert werden sollten, war es zudem notwendig, ein geeignetes *in vitro*-Testsystem zu entwickeln, mit dem eine Messung der Aktivität der Toxine jederzeit möglich ist.

Die Funktionalität des Adapters sollte in *in vitro*-Versuchen nachgewiesen und gegebenenfalls die spaltbaren Sequenzen so modifiziert werden, dass die ihnen zugeordnete Rolle optimal erfüllt wird. Nach der erfolgreichen Darstellung verschiedener Immunotoxinkonstrukte mit und ohne Adapter sollten mittels eines Cytotoxizitätsassays an verschiedenen Zelllinien IC_{50} -Werte ermittelt und somit die Spezifität der Immunotoxine untersucht werden. Weiter sollte die Auswirkung des Adapters auf Nebenwirkungen für normaldifferenzierte Zellen in der Zellkultur untersucht werden.

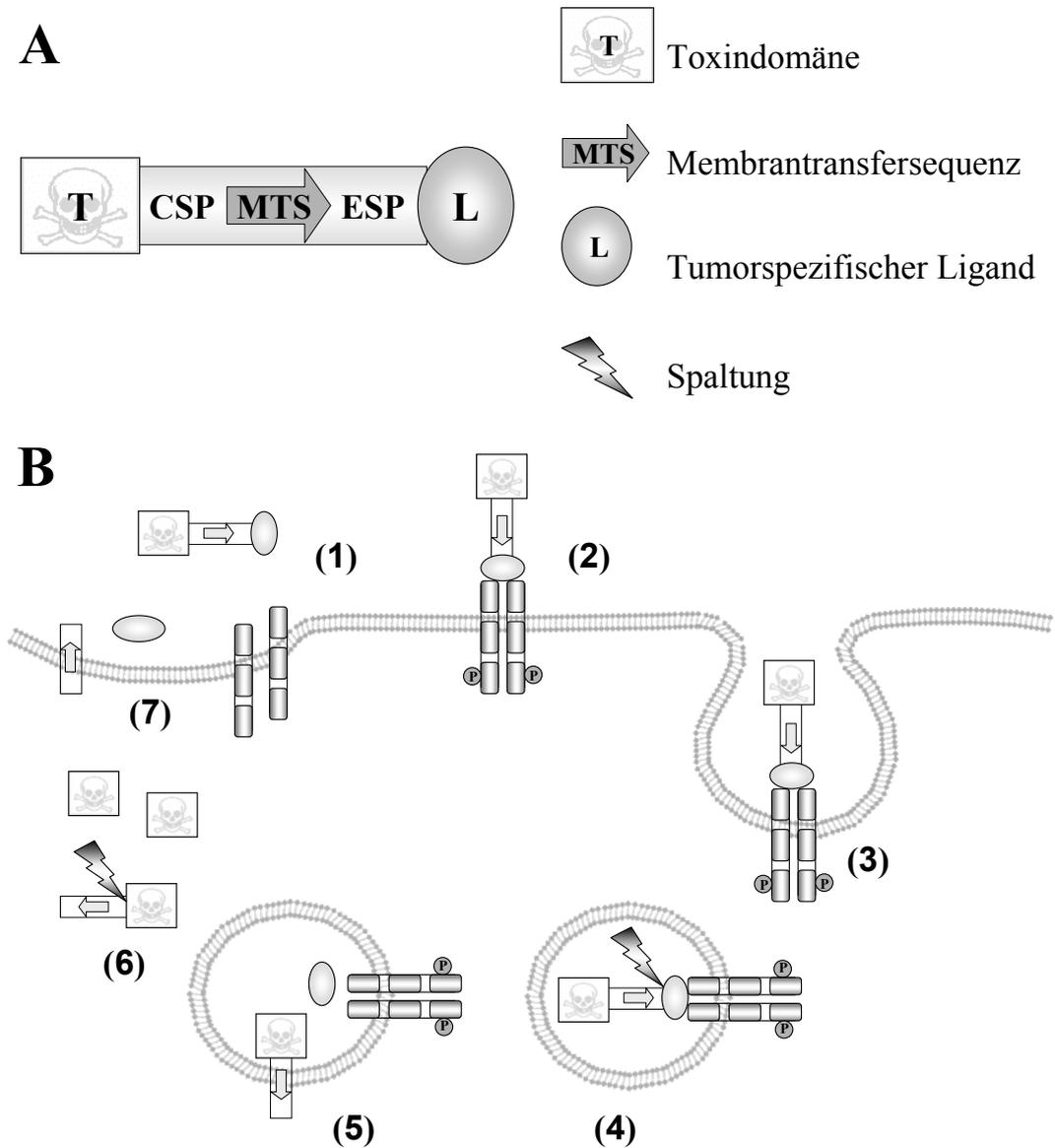


Abbildung 2: Molekularer Aufbau eines Immunoadaptertoxins und postulierter Mechanismus der zellulären Aufnahme. **(A)** Darstellung des Gesamtkonstruktes, bestehend aus der katalytisch aktiven Domäne eines Proteintoxins (welches ohne Translokationsdomäne nicht in die Zelle aufgenommen werden sollte), dem Adapter und einem tumorspezifischen Liganden. ESP steht für endosomal spaltbares und CSP für cytosolisch spaltbares Peptid. **(B)** Zellulärer Aufnahme-mechanismus: (1) Bedingt durch den tumorspezifischen Liganden bindet das Gesamtkonstrukt an den Rezeptor. (2) Nach der Bindung kommt es im Falle des EGF-Rezeptors zu einer Auto-phosphorylierung. Anschließend (3) wird der an den Rezeptor gebundene Ligand mit dem Rezeptor zusammen endocytiert. Ein direkter Transfer des Konstruktes durch die Cytoplasmamembran ist ohne Rezeptorbindung und Endocytose nicht möglich, da die Transfersequenz zunächst durch ihre Substituenten an beiden Seiten blockiert wird. (4) In den Endosomen kommt es durch Proteolyse zur Abspaltung des tumorspezifischen Liganden (Spaltung der ESP) und damit zur Aktivierung der Membrantransfersequenz, die nachfolgend (5) für den Transport der katalytischen Domäne ins Cytosol verantwortlich ist. (6) Nach Abspaltung der Transfersequenz (Spaltung der CSP durch Proteolyse) akkumuliert die toxische Domäne im Cytosol. (7) Angelangt an ihrem Wirkort, dem Cytosol, wird durch die toxische Domäne schließlich der Zelltod ausgelöst. Der Rezeptor wird entweder recycelt oder im lysosomalen Weg abgebaut.